



## ***Rhodotorula glutinis* e sospetta dermatosi in un cane - Suspect of *Rhodotorula glutinis* dermatoses in a dog**

Agnetti F., Moretta I., Danesi P., Moretti R., Crotti S., Anzalone L., Moretti A.

**Abstract.** This paper describes a case of suspected dermatitis caused by *Rhodotorula glutinis*, in a dog. This fungus nowadays considered "marginal" but emerging in the medical and veterinarian healthcare field. The subject, showed a clinical signs characterized by generalized pyoderma, without pruritus, alopecia-crusted lesions, sometimes exude more apparent on the head, the ears, back and chest. An initial treatment with amoxicillin + clavulanic acid and clindamycin, has not lead to good results. Culture test performed from skin samples have allowed us to isolate *R. glutinis*, then typed with biochemical methods (API ID 32C - Biomerieux®) and molecular (PCR). Treatment with ketoconazole, initially at a dose of 350 mg / kg / SID for two months, then increased to 500mg for a further two months, provided a sharp improvement in the skin conditions, confirmed by the negativity of the control cultures

**Riassunto.** Nel presente lavoro si descrive un caso di sospetta dermatosi in un cane sostenuta da *Rhodotorula glutinis*, micete fino ad oggi considerato "marginale" ma emergente in ambito sanitario, sia medico che veterinario. Il soggetto in questione mostrava un quadro clinico di piodermite generalizzata, senza prurito, con lesioni alopecico-crostose, a tratti essudate, maggiormente evidenti sulla regione della testa, sui padiglioni auricolari, sul dorso e sul torace. Un primo trattamento con amoxicillina + acido clavulanico e clindamicina, non ha sortito risultati apprezzabili. Gli esami colturali eseguiti a partire da campioni cutanei hanno permesso di isolare *R. glutinis* in purezza, successivamente tipizzata con metodo biochimico (API ID 32C – Biomerieux®) e molecolare (PCR). Il trattamento con ketoconazolo, inizialmente alla dose di 350 mg/kg/SID per due mesi, poi aumentato a 500mg per ulteriori due mesi, ha fornito un netto miglioramento del quadro cutaneo, confermato dalla negatività degli esami colturali di controllo.

### **Introduzione**

I miceti del genere *Rhodotorula* (Harrison, 1928) sono lieviti spesso isolati da fonti ambientali (suolo, acqua), alimentari (frutta fresca, latte) e comunemente presenti, come flora saprofita, anche sulla cute umana e animale (Andreoni et al., 2003). Le specie più citate in letteratura sono *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta* e *R. mucilaginoso* (conosciuta anche col sinonimo di *R. rubra*), a cui seguono anche *R. aurantiaca* e *R. marina*. Kurtzman e Fell citano, inoltre, ben 34 varietà di *Rhodotorula*, comunemente accettate come specie, con differenziati caratteri biologici (Kurtzman, 1999). Precedentemente classificati come non patogeni, i lieviti del genere *Rhodotorula* sono risultati in grado di comportarsi da patogeni opportunisti, colonizzando ed infettando pazienti sensibili.

In medicina umana, l'isolamento di *Rhodotorula* spp., in particolare di *R. rubra*, è segnalato a partire da campioni cutanei, urinari, fecali e respiratori, specie da pazienti immunocompromessi. *R. rubra* può eccezionalmente essere causa di peritonite in pazienti sottoposti a dialisi peritoneale continua, di ulcere corneali, di fungemia, di endocardite e meningite in pazienti neoplastici in fase avanzata di malattia o in soggetti sottoposti a terapie immunosoppressive (Andreoni et al, 2003; Francois e Rijssaiere, 1979; Goldani et al, 1995; Gyaurgieva et al, 1996). Sono a rischio, per contaminazione, anche pazienti sottoposti a chirurgia addominali, a cateteri vascolari a permanenza, o sofferenti di malattie autoimmuni (Miceli et al, 2011).

In ambito veterinario, il comportamento dei miceti del genere *Rhodotorula* è sovrapponibile a quello osservato in ambito umano; il loro isolamento è frequente da substrati ambientali, quali suolo, acqua, lettiera e da prodotti di origine animale, come il latte. Il ruolo di tali lieviti come patogeni opportunisti è documentato soprattutto in specie aviari, in corso di dermatopatie segnalate soprattutto a carico di polli da carne. Casi di dermatite in broiler d'allevamento intensivo, con isolamento di *R. rubra* e *R. glutinis*, sono descritti da vari Autori (Arno, 1980; Beemer et al, 1970; Page et al, 1976). I quadri clinici riferiti sono generalmente rappresentati da dermatite gangrenosa-necrotizzante, particolarmente evidente a carico delle regioni del collo, del torace e del dorso, con

sensibili tassi di calo ponderale e successiva mortalità dei volatili infetti (circa il 50-60%)<sup>3</sup>. Sempre in ambito veterinario, la presenza di lieviti del genere *Rhodotorula* è segnalata anche come possibile responsabile di problematiche auricolari.

Duarte e collaboratori, in un interessante studio epidemiologico, hanno valutato la prevalenza di lieviti e funghi miceliali in corso di otiti parassitarie in bovini allevati in Brasile: su 45 colture micotiche ottenute da tamponi auricolari di bovini affetti da otite, n. 31 (68,9%) sono risultati positivi per lieviti del genere *Malassezia*, n. 7 (15,5%) per il genere *Candida* e n. 5 (11,1%) per il genere *Rhodotorula* (successivamente tutti tipizzati come *R. mucilaginosa* (Duarte et al., 2001). Sempre in ambito bovino, *Rhodotorula* spp. è stata isolata in forme di mastite micotica (Costa et al., 1993). Fra gli animali da compagnia, è stato descritto da Bourdeau un caso di sospetta dermatomiosi da *Rhodotorula* in un gatto FeLV e FIV positivo: il quadro cutaneo era rappresentato da lesioni crostose, compatte, di colore bruno-rossastro, distribuite sulla regione nasale, perioculare e podale.

L'esame colturale, effettuato su Sabouraud dextrose agar addizionato di cloramfenicolo ed incubato a 27°C, ha permesso di isolare lieviti successivamente identificati come *R. mucilaginosa*. Inoltre, è stato descritto un caso di epididimite da *R. glutinis* in un cane<sup>14</sup> ed un caso sospetto di polmonite da *R. pilimanae* (sin. *R. mucilaginosa*) in un gatto affetto da FeLV<sup>17</sup>. Vari isolamenti sono stati ottenuti dal condotto uditivo di cani e gatti, sia affetti da otite che esenti da tale patologia (Amaral et al, 1998; Chenogappaet al, 1983; Guedeja Marron, 1997), unitamente ad isolamenti dalla mucosa congiuntivale di gatti clinicamente sani<sup>18</sup>. Infine, è stato descritto un caso di cheratite in un cavallo, in associazione al genere *Cryptococcus* (Duarte et al, 2001). In tale ottica, agli Autori è sembrato interessante riportare un caso clinico di sospetta dermatosi da *R. glutinis* in un cane, allo scopo di richiamare l'attenzione sul possibile coinvolgimento di funghi fino ad oggi considerati "marginali" ma emergenti in ambito sanitario, a cui occorre rivolgere attenzione soprattutto dal punto di vista epidemiologico e patogenetico.

### Presentazione del caso

Leon, cane padronale di razza Rottweiler, è un maschio intero, di anni 6, regolarmente vaccinato ed alimentato con diete commerciali, vivente in ambiente domestico. Ad una prima visita ambulatoriale, il soggetto mostrava un quadro dermatologico riconducibile ad una piodermite generalizzata, a tratti profonda, con assenza di prurito. Le lesioni, caratterizzate da un aspetto alopecico-crostoso, a tratti con essudazione, erano maggiormente evidenti sulla regione della testa, sui padiglioni auricolari, sul dorso e a livello di regione toracica (Figura 1, 2, 3). Un primo trattamento con amoxicillina + acido clavulanico e clindamicina, non ha sortito risultati apprezzabili.





2



3

Figure: 1, 2, 3, Dettaglio delle lesioni con aspetto alopecico-crostoso ed essudazione (testa, padiglioni auricolari, dorso regione toracica)

### Esami eseguiti

Sono stati effettuati tamponi cutanei, prelevati dalle sedi di lesione, per l'allestimento dell'esame batteriologico standard (semina su agar sangue (AS), Mannitol Salt agar (MSA) e Mc Conckey agar ed incubazione in aerobiosi a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  per 24-48 ore) e dell'esame colturale micologico; per quest'ultimo, la semina su piastre è stata effettuata su Sabouraud dextrose agar (SDA) con aggiunta di cloramfenicolo (0,5g/l) e su SDA con aggiunta anche di actidione (0,5g/l), successivamente incubate in aerobiosi a  $26\pm 1^\circ\text{C}$  per 20gg.

Sono stati, inoltre, eseguiti un esame emato-biochimico, un test sierologico per la ricerca di anticorpi specifici anti-*Leishmania donovani infantum* mediante immunofluorescenza indiretta (IFI), ed un esame istologico effettuato su due campioni cutanei prelevati al centro ed alla periferia di un'area sede di lesione.

Le piastre sono state osservate quotidianamente; le colonie fungine sospette sono state trapiantate in purezza su SDA (senza aggiunta di inibitori), poi sottoposte ad esame microscopico colorato mediante blu di metilene ed a tipizzazione biochimica (mediante sistema API ID 32C - Biomerieux®) e molecolare (PCR), tramite estrazione ed amplificazione del DNA ribosomale con l'utilizzo di primers universali ITS1 e ITS4. La sequenza ottenuta dal prodotto di amplificazione

(mediante ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer - Applied Biosystem, Foster City, CA-USA) è stata analizzata e confrontata con quelle presenti nelle banche dati internazionali (<http://www.mycobank.org>).

### Risultati

L'esame batteriologico è risultato negativo. L'esame colturale micologico ha evidenziato, dopo 48-72 ore d'incubazione, la crescita di colonie di aspetto cremoso, mucoide, lucente, di colore rosa salmone, con profilo liscio e regolare (Figura 4); l'esame microscopico delle colonie ha consentito di osservare cellule ovoidali (2,3-5 x 4-10 $\mu$ m) (Figura 5). La tipizzazione biochimica con sistema miniaturizzato API ha permesso di classificare tali colonie come *Rhodotorula glutinis* (identificazione al 98,8%); l'analisi molecolare ha confermato l'identificazione del lievito *Rhodotorula glutinis* (100% di omologia).



Figura 4. Colonie di *Rhodotorula glutinis*

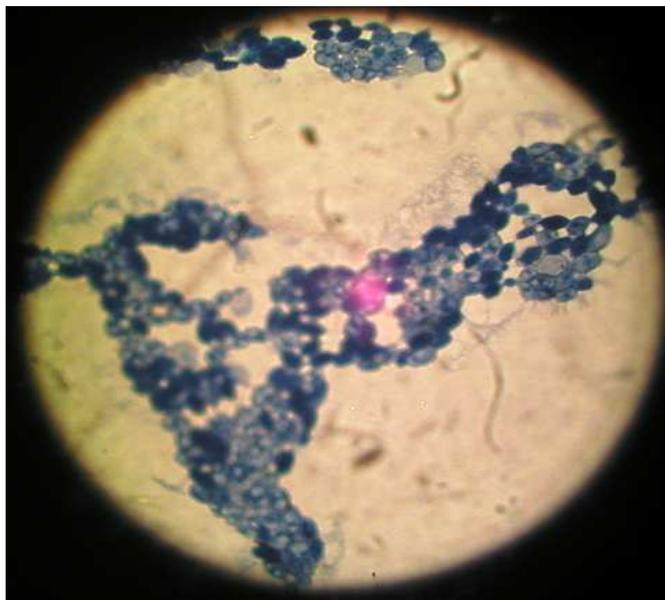


Figura 5. Esame microscopico. Si evidenziano le tipiche cellule ovoidali di *Rhodotorula glutinis*

L'esame emato-biochimico è risultato nella norma; il test di IFI per *Leishmania* è risultato negativo. L'esame istologico ha evidenziato, in entrambi i campioni, iperplasia epidermica (più marcata nel campione prelevato al centro della lesione) regolare e diffusa, associata a lieve ipercheratosi lamellare; nel derma superficiale si sono osservati edema ed iperemia correlati ad un moderato infiltrato infiammatorio, in sede prevalentemente perivasale, caratterizzato da mastociti, linfociti, plasmacellule, macrofagi e da un numero inferiore di granulociti eosinofili.

Multifocalmente si è osservata incontinenza del pigmento con presenza di melanomacrofagi nel derma superficiale.

La colorazione istochimica PAS non ha consentito di evidenziare forme micotiche. Il quadro istologico è risultato quello di una dermatopatia riferibile a stato di ipersensibilità cronico-attivo. A seguito dei risultati ottenuti, il cane è stato sottoposto a terapia con itraconazolo alla dose di 10 mg/kg/SID per due mesi.

A fronte di uno scarso miglioramento clinico, la terapia è stata sostituita con ketoconazolo alla dose di 350 mg/kg/SID, sempre per due mesi.

Un successivo esame colturale post terapia ha mostrato ancora presenza di *R. glutinis*, per cui il dosaggio del ketoconazolo è stato aumentato a 500mg.

Dopo ulteriori due mesi di terapia, l'animale ha mostrato un netto miglioramento del quadro cutaneo, confermato dalla negatività degli esami colturali di controllo.

## Conclusioni

Negli ultimi anni, sia in medicina umana che veterinaria, accanto a miceti "accreditati" nel causare differenziate forme cliniche, sono emerse specie normalmente considerate saprofiti, capaci però di causare stati morbosi (miceti emergenti dal carattere opportunistico). Sono da segnalare a tal proposito specie di *Candida non albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, ed i generi *Hansenula*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Acremonium* e *Rhodotorula*. Pur con le dovute riserve che il caso impone, tenendo conto dei risultati ottenuti dagli esami di laboratorio, si possono formulare le seguenti considerazioni conclusive:

1. l'isolamento abbondante e ripetuto nel tempo del lievito ed il suo ottenimento in coltura pura, unitamente all'insuccesso della terapia antibiotica ed alla remissione dei sintomi dopo trattamento antimicotico, depongono a favore di una possibile associazione eziologica tra il lievito isolato e la patologia insorta;
2. è palese che una presenza micotica nei reperti istologici avrebbe dato un maggiore riscontro ed una più solida certezza alle conclusioni a cui si è giunti; occorre però sottolineare che reperti biotici cutanei negativi, con impiego di colorazioni istologiche selettive (PAS, Gomori-Grocott), sono stati ottenuti anche da Beemer e collaboratori (1970) e da Bourdeau e collaboratori (1992).

Gli autori francesi evidenziano nello spessore del derma solo qualche raro elemento ovoidale, senza bourgeonnement visibile, utilizzando la colorazione Ematossilina-Eosina-Safranina (HES)(Bourdeau et al., 1992).

Page e collaboratori (1976), a partire sia da casi clinici di dermatite da *R. glutinis* in polli broiler che da casi sperimentali (utilizzando una sospensione dello stesso lievito contenente  $1 \times 10^8$  organismi), riportano che gli esami istologici cutanei, eseguiti con colorazioni PAS e Gridley, non hanno rivelato organismi micotici, ma soltanto una severa dermatite con numerose cellule necrotiche nelle aree adiacenti al derma. Ipotesi possibili giustificanti tale dato potrebbero prevedere:

- a. una naturale e scarsa presenza fungina nello spessore cutaneo,
- b. un campionamento esiguo dal punto di vista dimensionale,

- c. un'iniziale efficacia terapeutica che potrebbe aver inciso sulla reale presenza del lievito in sede di lesione (probabilmente il nostro caso);
3. la mancanza di riferimenti bibliografici specifici riguardanti il trattamento terapeutico nella specie canina ha indotto gli Autori ad intraprendere scelte differenziate ed a prolungare la somministrazione per un periodo piuttosto lungo.

I punti interrogativi che ruotano intorno a tale lievito sono ancora molti (epidemiologia, vie d'ingresso nell'organismo, fattori di virulenza, patogenesi); il nostro rilievo vuol richiamare l'attenzione su un argomento di studio coinvolgente l'operato sia del clinico veterinario che dello specialista del settore umano.

## Bibliografia

- Amaral R.C., Ibanez J. F., Mamizuka E. M., Gambale W., de Paula C. R., Larsson C. E. (1998). Normal microflora of the ear canal of healthy cats. *Ciencia rural*, 28(3): 441-445.
- Andreoni S., Farina C., Lombardi G. (2003). *Atlante di Micologia Medica*. Ed. Systems. Vigano di Gaggiano (MI).
- Arno S.K. (1980). Necrotizing cutaneous Rhodotorulosis in chickens in Uganda. *Avian Diseases*, 24(4): 1038-1043.
- Beemer A.M., Schneerson-Porat S., Kuttin E.S. (1970). *Rhodotorula mucilaginosa* dermatitis on feathered parts of chickens: an epizootic on a poultry farm. *Avian Diseases*, 14(2): 234-239.
- Bourdeau P., Hubert B., Magnol J.P. (1992). Suspicion de dermatomycose à *Rhodotorula mucilaginosa* chez un chat infecté par le FeLV et le FIV. *Recueil de Médecine Veterinaire*, 168(2): 91-96.
- Chengappa M.M., Maddux R., Greer S. (1983) A microbiologic survey of clinically normal and otitic ear canals. *Pet Practice* 78: 343-344.
- Costa E. O., Gandra C. R., Pires M. F., Coutinho S. D., Castilho W., Teixeira C. M. (1993). Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 124: 13-17.
- Desbrosse A.M. (1996). Cryptococcus mycotic keratitis in a horse. *Pratique Vet. Equine*, 28(2): 147-148.
- Duarte E.R., Resende J.C.P., Rosa C.A., Hamdan J.S. (2001). Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the state of Minas Gerais, Brazil. *J. Vet. Med.*, B48: 631-635.
- Francois J., Rijssalaere M. (1979). Corneal ulcer infection by *Rhodotorula*. *Ophtalmologica*, 178: 241-243.
- Goldani L. Z., Craven D. E., Sugar A. M. (1995). Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in a patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole. *J. Med. Vet. Mycol.* 33: 267.
- Guedeja Marron J., Blanco J. L., Garcia M. E. (1997). Antimicrobial sensitivity in microorganisms isolated from canine otitis externa. *Zentralbl Veterinarmed B*, 44(6): 341-346.
- Gyaurgieva O. H., Bogomolova T. S., Gorshkova G. I. (1996). Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an HIV-infected patient. *J. Med. Vet. Mycol.*, 34: 357-359.
- Kodota K., Uchida K., Nagamoto T., Goto Y., Shinjo T., Hasegawa T., Ogawa H., Yamaguchi R., Tateyama S. (1995). Granulomatous epididymitis related to *Rhodotorula glutinis* infection in a dog. *Vet. Pathol.*, 32(6): 716-718.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. (1999). *The yeasts, a taxonomic study*. Fourth Ed., Elsevier.

Miceli, M.H., Díaz, J.A., Lee, S.A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infectious Diseases*, 11:142-151.

Montinaro S., Sanna S., Preti C. M., Montanaro B. (2000). Sospetta polmonite da *Rhodotorula pilimanae* in un gatto affetto da leucemia felina. *Summa*, 17(1): 77-80.

Moretti A., Arcelli R., Boncio L., Tibaldini P., Vergara M., Salvatori R., Agnetti F., Rossodivita M., Vidotto V. (2006). Fungi in conjunctival sacs of clinically normal cats. Atti del "16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology", Parigi, 25-29 giugno: P521.

Page R.K., Fletcher O.J., Eidson C.S., Michaels G.E. (1976). Dermatitis produced by *Rhodotorula glutinis* in broiler-age chickens. *Avian Diseases*, 20(2): 416-421.

*Gli Autori sono grati al Prof. Luca Mechelli, del Dip.to di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari di Perugia, per il contributo fornito relativamente all'esame istopatologico.*

*Si ringrazia inoltre la Banca Popolare di Spoleto, per il supporto economico fornito ai fini della realizzazione della presente indagine.*

## Affiliazioni

Agnetti F.<sup>1</sup>, Moretta I.<sup>2</sup>, Danesi P.<sup>3</sup>, Moretti R.<sup>4</sup>, Crotti S.<sup>1</sup>, Anzalone L.<sup>1</sup>, Moretti A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia

<sup>2</sup>Dip.to di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Perugia

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

<sup>4</sup>Veterinario libero professionista, Perugia



*Rhodotorula glutinis* e sospetta dermatosi in un cane by Francesco Agnetti et al. 2012 is licensed under a Creative Commons Attribuzione - Non commerciale 3.0 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	<b>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy</b>
<b>Centralino Istituto</b>	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
<b>Biblioteca</b>	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: <a href="mailto:bie@izsum.it">bie@izsum.it</a>
<b>Rivista SPVet.it</b> ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: <a href="mailto:editoria@izsum.it">editoria@izsum.it</a> ; <a href="mailto:redazione-spvet@izsum.it">redazione-spvet@izsum.it</a> <a href="http://spvet.it">http://spvet.it</a> ; <a href="http://indice.spvet.it">http://indice.spvet.it</a>
<b>U. R. P.</b>	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: <a href="mailto:URP@izsum.it">URP@izsum.it</a>